



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(SU) 1602869 A1

(51)5 C 12 Q 1/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4426085/31-13

(22) 16.05.88

(46) 30.10.90. Бюл. № 40

(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт биологического приборостроения

(72) Н. С. Осин

(53) 577.15(088.8)

(56) Петухов В. Г., Осин Н. С. Длительная люминесценция микроорганизмов: природа и применение. - Успехи микробиологии, 1989, т. 23.

Авторское свидетельство СССР
№ 1339130, кл. C 12 Q 1/02, 1987.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Изобретение может быть использовано в биотехнологии при производстве препаратов путем микробиологического синтеза. Целью изобретения является повышение чувствительности и упроще-

ние способа. В кварцевую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой пробы с Е. coli M-17 в виде водной суспензии с концентрацией клеток 10^9 микробных тел в 1 мл и 10 мл бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с цинкпротопорфирином IX. Концентрация белка 1 мг/мл, соотношение белок - флуорохром 1:10 (в молях). Пробу помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, облучают видимым светом от лампы накаливания и регистрируют фотоприемником кинетику изменения сигнала длительной люминесценции с $\tau > 10^{-4}$ с в процессе поглощения кислорода. Способ заключается во введении длиннолюминесцирующего (с $\tau > 10^{-4}$ с) флуорохрома на носители и измерении кинетики изменения сигнала с последующей оценкой результата по формуле. 1 ил., 1 табл.

Изобретение относится к микробиологии и может найти применение в биотехнологии при производстве препаратов путем микробиологического синтеза.

Цель изобретения - повышение чувствительности способа и его упрощение.

Способ заключается в том, что в пробу вводят длиннолюминесцирующий (с $\tau \geq 10^{-4}$ с) флуорохром на носителе ковалентно и/или сорбционно связанный с ним, регистрируют кинетику изменения уровня сигнала длительной люминесценции, а дыхательную активность рассчитывают по формуле

$$V_0 = \frac{1}{K_q} \frac{4,5}{2,2 \Delta t_1 - 0,8 \Delta t_2}$$

где K_q - константа тушения флуорохрома кислородом;

Δt_1 - интервал времени, за который уровень длительной люминесценции увеличился от $0,1 I_0$ до $0,2 I_0$ (I_0 - уровень максимального свечения пробы после поглощения из среды кислорода);

Δt_2 - интервал времени, соответствующий возрастанию интен-

(SU) 1602869 A1

сивности люминесценции с $0,1 I_0$ до $0,5 I_0$.

В качестве флуорохромов используют широкий набор длиннolumинесцирующих с единений (ароматические углеводороды, гетероциклические соединения, например порфирины и их металлокомплексы, пирен, бензопирен, флавины и их производные). В качестве носителей используют белки, ковалентно или адсорбционно связанные с флуорохромом, латексные частицы и другие сорбенты.

Использование в качестве индикатора флуорохрома на носителе резко увеличивает его способность к длительной люминесценции за счет устранения тушающего действия воды.

Предлагаемый способ обеспечивает повышение чувствительности. Это обеспечивается двумя факторами: исключением дозирования кислорода с помощью водного раствора и введением в пробу индикатора с известной характеристикой тушения кислородом его длительной люминесценции. Введение этих операций позволяет резко уменьшить объем анализируемых проб до единиц микролитров, т.е. повысить чувствительность анализа.

Оптимальным диапазоном для регистрации I_1 , I_2 , I_3 является диапазон от $0,1 I_0$ до $0,5 I_0$. Это связано с тем, что при $I_1 < 0,1 I_0$ возрастает ошибка от вклада длиннolumинесцирующих примесей, а при $I_1 > 0,1 I_0$ у микроорганизмов может существовать альтернативный путь поглощения кислорода, вклад от которого заметен лишь при крайне низких концентрациях кислорода.

Вклад альтернативного пути поглощения кислорода становится заметным при $I_1 > 0,5 I_1$, т.е. при концентрациях кислорода, много меньших константы Михаэлиса основного пути.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. Металлопорфирин (флуорохром) растворяют в воде ($10^{-4} M$) и смешивают с карбодинидом в соотношении 1:2 (M), после 30 мин инкубации при комнатной температуре в реакционную смесь добавляют белок (бычий сывороточный альбумин) в молярном отношении 10:1 (флуорохром:белок). Через 4 ч инкубации гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-50 отделяют конъюгат от свободного (несвязавшегося)

металлопорфирина. В качестве элюента используют трис-буфер (pH 7,2). Конъюгат (флуор хром-белок) разливают в отдельные ампулы и высушивают лиофильно.

Пример 2. Один из флуорохромов (эозин, бензопирен, пирен, металлопорфирин) растворяют в воде ($10^{-4} M$) и смешивают с меланинформальдегидной смесью по известному способу. Затем проводят отмывку латексов от несвязавшегося флуорохрома седиментацией или центрифугированием. Латексы хранят в виде водного раствора.

Пример 3. Латексы с флуоресцентной меткой на основе полистирола получают смешиванием флуорохрома с эмульсией стирола с последующей его полимеризацией.

Затем реакционную смесь освобождают центрифугированием или седиментацией от свободного флуорохрома. Латексы хранят в виде эмульсии или лиофильно высушенных частиц.

Пример 4. В кварцевую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой пробы с *E. coli* M-17 в виде водной суспензии с концентрацией клеток 10^9 микробных тел в мл (м.т./мл) и 10 мкл бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с цинкпротопорфирином IX. Концентрация белка 1 мг/мл, соотношение белок:флуорохром 1:10 (в молях).

Пробу помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, облучают видимым светом (400-700 нм) от лампы накаливания марки КГМ 15 Вт и фотоприемником ФЭУ-14 регистрируют кинетику изменения сигнала длительной люминесценции (с $\tau > 10^{-4} c$) в процессе поглощения кислорода.

На чертеже представлена кинетика (А) изменения сигнала длительной люминесценции в процессе поглощения кислорода.

Находят время увеличения сигнала с $0,1$ до $0,2 I_0$ и до $0,5 I_0$, равное 1 и 2 мин соответственно. С учетом константы тушения K_d для цинкпротопорфирина IX, равной $1,6 \cdot 10^7 m^{-1}$, по формуле получают величину дыхательной активности микроорганизмов в пробе, равную $0,47 \cdot 10^{-6} M [C_2]/мин \cdot 10^9 m.т.$

Пример 5. Способ осуществляют аналогично примеру 1. В качестве флуорохрома используют пирен, в каче-

ств и сителя - частицы полистирола диаметром 5-20 мкм. Концентрация пирена в пробе 10^{-5} М.

На чертеже представлена кинетика (а) изменения сигнала длительной люминесценции флуорохрома в процессе поглощения кислорода из пробы. С учетом константы тушения для данного флуорохрома $K_q = 8 \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$, а времена $\Delta t_1 = 0,57 \text{ мин}$, $\Delta t_2 = 1,08 \text{ мин}$ расчетом по формуле находят дыхательную активность микроорганизмов в пробе, равную $0,47 \cdot 10^{-6} \text{ М } [O_2]/\text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.г.}$

Из сравнительных данных примеров и 2 видно, что независимо от типа используемого флуорохрома и носителя скорость поглощения кислорода в обоих случаях оказалась равной.

П р и м е р 6. Ампулу с вакциной БЦЖ (1 мг сухой биомассы) вскрывают и разводят дистиллированной водой (0,2 мл). После регистрации в течение 15 мин суспензию микроорганизмов переносят в измерительную ампулу диаметром 5 мм и вносят 10 мкл меламинформальдегидных латексов ($2,5 \cdot 10^8 \text{ мл}$) с триафлавином ($3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$). Время восстановления люминесценции от $0,1 I_{\text{макс}}$ до уровня $0,2 I_{\text{макс}}$ составило 9 мин, а до уровня $0,5 I_{\text{макс}}$ 16 мин соответственно. С учетом константы тушения $K_q = 2 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1}$ для триафлавина скорость поглощения кислорода, рассчитанная по формуле, составляет

$$V_o = \frac{1}{2 \cdot 10^7} \cdot \frac{4,5}{2,2 \cdot 9 - 0,8 \cdot 16} =$$

$$= 0,5 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{4,5}{19,8 - 10,8} =$$

$$= 0,25 \cdot 10^{-7} \text{ М } [O_2]/\text{мин/мг сух. массы}$$

П р и м е р 7. В кварцевую пробирку диаметром 2 мм вносят 5 мкл пробы, содержащей 10^5 клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и 2 мкл конъюгата бычьего сывороточного альбумина с $Al(OH)$ -компропорфирином в концентрации 10 мг/мл в молярном соотношении белок:порфирин 1:10.

Пробирку с пробой помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, блуждают видимым светом лампы накалывания КГМ 15 Вт и фотоприемник м ФЭУ-114 регистрируют кинетику изменения сигнала длительной лю-

минесценции ($\tau > 10^{-4} \text{ с}$) в процессе поглощения кислорода. На чертеже представлена кинетика (в) изменения сигнала в процессе поглощения кислорода. Расчет по формуле с учетом $\Delta t_1 = 2 \text{ мин}$, а $\Delta t_2 = 4 \text{ мин}$ и константы тушения для данного флуорохрома, равной $K_q = 1,8 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1}$, находят дыхательную активность микроорганизмов в пробе, равную $2,8 \cdot 10^{-7} \text{ М } [O_2]/\text{мин} \cdot 10^5 \text{ м.г.}$

В таблице представлены данные по сравнительной с известным способом оценке чувствительности предлагаемого. В качестве флуорохрома на носителе использовали $Al(OH)$ на бычьем сывороточном альбумине.

Из данных таблицы видно, что предлагаемый способ позволяет повысить чувствительность анализа за счет резкого уменьшения объема анализируемых проб. При уменьшении объема пробы с 1 мл до 0,1 мл в прототипе заметно увеличивается ошибка определения, связанная с некорректностью приема дозирования кислорода.

Таким образом, предлагаемый способ может быть использован для решения различных задач в области биотехнологии, где необходимо производить оценку дыхательной активности в малых объемах проб с низкой концентрацией клеток или с низким уровнем дыхательной активности.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения дыхательной активности микроорганизмов путем введения в пробу флуорохромов, облучения пробы светом и регистрации кинетики изменения сигнала длительной люминесценции с последующей оценкой результата, отличающийся тем, что, с целью повышения чувствительности и упрощения анализа, из флуорохромов используют длиннoluminesцирующий флуорохром с $\tau > 10^{-4} \text{ с}$ на носителе, а оценку результата ведут по формуле

$$V_o = \frac{1}{K_q} \cdot \frac{4,5}{2,2 \Delta t_1 - 0,8 \Delta t_2}$$

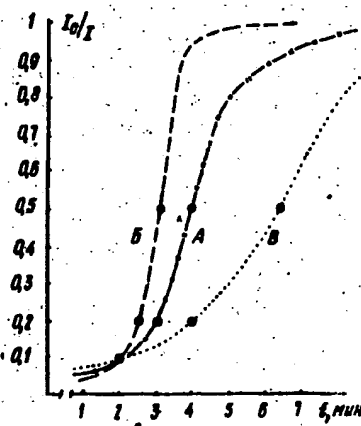
где V_o - дыхательная активность;
 K_q - константа тушения люминесценции флуорохрома кислородом, м^{-1} ;

Δt_1 - интервал времени, соответствующий увеличению сигнала люминесценции от $0,1 I_0$ до $0,2 I_0$, I_0 - максимальный уровень люминесценции про-

бы после поглощения кислорода;

Δt_2 - интервал времени, соответствующий увеличению уровня люминесценции от $0,1 I_0$ до $0,5 I_0$.

Состав пробы, микроорганизм	Концентрация (микробных тел/мл)	Объем пробы, мл	Результаты анализа по способу	
			известному	предлагаемому
<i>E. coli</i> M-17	10^9	2	$0,52 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,47 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,5	$0,60 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,47 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,1	$0,75 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,48 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,005	Не определяется	$0,49 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>Sacch. cerevisiae</i>	10^6	0,005	- " -	$0,7 \cdot 10^{-7} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^6 \text{ м.т.}$
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10^9	0,005	- " -	$0,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}[\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$



Составитель А. Карякин

Редактор Н. Киштулинец

Техред Л. Сердюкова Корректор Т. Колб

Заказ 3360

Тираж 484

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Пр изводственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101

WEST

Number of documents to display is limited to 10 for FULL format

Generate Collection

Print

Search Results - Record(s) 1 through 1 of 1 returned.

☐ 1. Document ID: SU 1602869 A

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Oct 30, 1990

DERWENT-ACC-NO: 1991-199198

DERWENT-WEEK: 199127

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Determining respiratory activity of microorganisms - by addn. of persistent luminescent cpd. exposure to light, measuring kinetics of signal change, and use of formula

INVENTOR: OSIN, N S

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

BIOLOGY INSTRUMENTS

CODE

BIOLR

PRIORITY-DATA: 1988SU-4426085 (May 16, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

SU 1602869 A

October 30, 1990

000

APPLICATION-DATA:

PUB-NO

APPL-DATE

APPL-NO

DESCRIPTOR

SU 1602869A

May 16, 1988

1988SU-4426085

INT-CL (IPC): C12Q 1/02

ABSTRACTED-PUB-NO: SU 1602869A

BASIC-ABSTRACT:

Respiratory activity (V) of microorganisms is determined more efficiently as follows. A persistent (t of at least 0.1 msec.) fluorochrome on support is added to the sample contg. the microorganisms, exposed to light, and kinetics of the signal change is measured. The activity V is then calculated using the formula $V = (1/Kq) \cdot 4.5 / (2.2dt1 - 0.8dt2)$, where Kq is the quenching const. of the fluorochrome by O₂, dt1 and dt2 are the times of growth of persistent luminescence from 0.1 to 0.2 IO and from 0.1 to 0.5 IO, and IO is the level of max. luminescence after the absorption of O₂ from the medium.

USE/ADVANTAGE - In biotechnology for prodn. of preparations by microbiological synthesis. Simpler determ., increased accuracy. Bul.40/30.10.90

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/1

TITLE-TERMS: DETERMINE RESPIRATION ACTIVE MICROORGANISM ADD PERSISTENT LUMINESCENT
COMPOUND EXPOSE LIGHT MEASURE KINETIC SIGNAL CHANGE FORMULA

DERWENT-CLASS: D16 J04 S03

CPI-CODES: D05-H09; J04-C03;

EPI-CODES: S03-E04E; S03-E14H9;

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 1779U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1991-086478

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1991-152211

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Sequences	Attachments	Claims	RWC
Draw Desc	Image										

Generate Collection

Print

Terms

Documents

su-1602869\$.did.

1

Display Format:

FULL

Change Format

[Previous Page](#)

[Next Page](#)